昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, July 2008, 51(7):694 - 699　　ISSN 0454-6296

准噶尔小胸鳖甲融合抗冻蛋白活性的比较研究

李素丽,张富春,孙琳杰,刘璇,马纪*

(新疆大学生命科学与技术学院新疆生物资源基因工程重点实验室,乌鲁木齐 830046)

摘要:为了比较准噶尔小胸鳖甲 *Microdera punctipennis dzhungarica* 原核表达的不同融合抗冻蛋白活性是否存在差异,分别利用重组表达质粒 pGEX-4T-1-*Mpafp*5 和 pMAL-p2x-*Mpafp*5 在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)中诱导表达融合抗冻蛋白 GST-MpAFP5 和 MBP-MpAFP5,并利用亲和层析纯化蛋白。SDS-PAGE 分析结果证明获得了两种高效表达纯化的 GST-MpAFP5 和 MBP-MpAFP5 融合蛋白。在浓度为 0.5 mg/mL 时,两种蛋白的热滞值分别为 0.51℃和 1.336℃,其溶液冰晶形态均为棱型。抗冻保护实验结果显示:准噶尔小胸鳖甲两种融合抗冻蛋白均能够显著提高细菌在低温下的存活率,并且 MBP-MpAFP5 对细菌的保护效果显著高于 GST-MpAFP5。研究结果对于准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白的应用具有重要的理论意义。

关键词:准噶尔小胸鳖甲;抗冻蛋白;原核表达;热滞活性;冰晶形态

中图分类号:Q966　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0454-6296(2008)07-0694-06

Comparison of activities of fusion antifreeze proteins from *Microdera punctipennis dzhungarica* (Coleoptera: Tenebrionidae)

LI Su-Li, ZHANG Fu-Chun, SUN Lin-Jie, LIU Xuan, MA Ji* (Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: In order to compare the activity differences between the prokaryotic expressed MBP-MpAFP5 and GST-MpAFP5, the two recombinant prokaryotic expression plasmids pGEX-4T-1-*Mpafp*5 and pMAL-p2x-*Mpafp*5 were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) to obtain two different fusion antifreeze proteins of *Microdera punctipennis dzhungarica*. The two fusion proteins were purified by affinity chromatograph. SDS-PAGE analysis indicated that both of the fusion antifreeze proteins were highly expressed in soluble fractions. The thermal hysteresis activities (THA) of GST-MpAFP5 and MBP-MpAFP5 at a concentration of 0.5 mg/mL were measured as 0.51℃ and 1.336℃, respectively. The ice crystal morphology of both proteins displayed pyramid shape. Cryoprotection to bacteria experiments showed that the two fusion proteins could protect bacteria survival at subzero 7℃ temperature. Comparatively, MBP-MpAFP5 had higher protective activities than GST-MpAFP5. These results provide basic data for application of the insect antifreeze proteins in the future.

Key words: *Microdera punctipennis dzhungarica*; antifreeze protein; prokaryotic expression; thermal hysteresis activity; ice crystal morphology

抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)是一类能抑制冰晶生长和冰晶之间发生重结晶的蛋白质,能在结冰或亚结冰条件下保护生物体免受伤害。AFP 降低溶液冰点的作用效果不受分子数量的影响,而受蛋白质性质的影响,即非依数性地降低溶液的冰点,但不改变其熔点,从而导致溶液的熔点和冰点之间出现差值,这种差值称为热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)(DeVries, 1986)。由于抗冻蛋白独特的理化特性,使它在农业、医学和食品科学等领域具有广阔的应用前景。

基金项目:国家自然科学基金项目(30760056);新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题(XJDX0201-200804)

作者简介:李素丽,女,1982 年生,新疆额敏人,硕士研究生,专业为生物化学与分子生物学,E-mail:lslhaoa@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail:majiuci@xju.edu.cn

收稿日期 Received:2007-12-27;接受日期 Accepted:2008-04-10

抗冻蛋白存在于多种生物体中，包括鱼类、昆虫、植物、细菌和真菌。研究结果表明从昆虫中分离得到的抗冻蛋白其热滞活性是最高的（Tyshenko *et al*.，1997）。昆虫抗冻蛋白虽然具有很高的热滞活性，但由于个体一般较小，从昆虫体内分离纯化大量的天然抗冻蛋白用于研究和应用几乎是不可能的，因此通过基因工程方法异源过量表达才有望获得大量昆虫抗冻蛋白。研究表明昆虫抗冻蛋白具有独特的富含二硫键的 β-螺旋结构，其异源表达产物难以正确折叠，多以包涵体的形式出现（Tyshenko *et al*.，2006）。本研究以准噶尔小胸鳖甲 *Microdera punctipennis dzhungarica* 抗冻蛋白基因（*Mpafp*5）为研究对象，以两种重组原核表达质粒 pGEX-4T-1-*Mpafp*5 和 pMAL-p2x-*Mpafp*5 在大肠杆菌中进行融合表达，探讨 *Mpafp*5 与两种分子量大小不同的标签 GST（谷胱甘肽 S-转移酶）基因和 MBP（麦芽糖结合蛋白）基因重组能否表达获得可溶性的蛋白，解决可溶性抗冻蛋白的来源问题，并研究两种标签蛋白对 AFP 活性和热稳定性的影响，为昆虫抗冻蛋白的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含有准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白基因（*Mpafp*5，GenBank accession no.：AY821792）的原核表达质粒 pMAL-p2x-*Mpafp*5、pGEX-4T-1-*Mpafp*5 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 BL21（DE3）均由本实验室保存。低分子量蛋白 Marker、IPTG（异丙基-β-d-硫代半乳糖苷）购自三博生物工程公司；PMSF（苯甲基磺酰氟）购自 Bio-Rad 公司；Glutathione Sepharose 4B 为 Pharmacia 生物技术公司产品；Amylose Resin 为 Bio Labs 公司的产品。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 蛋白的表达与纯化：将准噶尔小胸鳖甲重组原核表达质粒 pMAL-p2x-*Mpafp*5、pGEX-4T-1-*Mpafp*5 及对照质粒 pGEX4T-1、pMAL-p2x 分别转化 *E*. *coli* BL21（DE3）。挑取单个转化菌落分别接入 3 mL LB（含 50 μg/mL 氨苄青霉素）液体培养基中，37℃ 160 r/min 振荡培养过夜。按 1%接种至含相同浓度氨苄青霉素的 LB 中，振荡培养至菌液 OD_{600} 0.4 ~ 0.7，加入 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L，振荡培养 4 h，诱导表达蛋白。然后以 8 000 r/min 在 4℃离心 10 min，收集菌体，重悬于适量的 2 × SDS 加样缓冲液中，沸水浴 10 min，12 000 r/min 在 4℃离心，取上清8 μL于 5% 的浓缩胶、12% 的分离胶上进行 SDS-PAGE 电泳。用 Alpha 公司的凝胶成像系统（Alpha Imager，2200 Documentation & Analysis System）记录结果并扫描电泳条带的 IDV（integrated density value）值。以不同浓度梯度的小牛血清蛋白（BSA）为参数，计算出融合抗冻蛋白的表达量。参照 Glutathione Sepharose 4B 和 Amylase Resin 树脂的说明书纯化表达的融合蛋白。纯化的融合蛋白经 12% SDS-PAGE 检测出单一的蛋白条带后，用 Bradford 法定量，置 －50℃保存备用。

1.2.2 热滞活性及热稳定性的测定：配制浓度为 0.5 mg/mL 的 MBP-MpAFP5，GST-MpAFP5，MBP，GST 溶液，用微升渗透压仪（precision systems inc Micro OSMETTE）测定溶液的渗透浓度值（osmotic concentration），单位是毫渗摩尔（mOsm），按仪器说明书换算成热滞值（THA）（1.0 Osm = －1.86℃）。每种蛋白溶液均测 3 个重复，取平均值。同时，另取上述蛋白溶液沸水浴 5 min，然后 12 000 r/min 离心 10 min。取离心后的上清液重复热处理一次，取上清测定 THA，检测所表达融合蛋白是否具有热稳定性，并对数据做方差分析。

1.2.3 冰晶形态的观察：用安装在显微照相机（Olympus BHT）上的一个纳升渗透压仪（Nanolitre Osmometer）观察抗冻蛋白溶液的冰晶形态。在载样片的小孔中加入油滴，用毛细管吸取抗冻蛋白溶液样品约 20 nL 加入到油滴中，使载样片快速降温至 －40℃，然后升至 0℃，第二次降温时在显微镜下观察样品溶液的冰晶形态，并拍照。

1.2.4 抗冻保护实验：取含有 pGEX-4T-1 *E*. *coli* BL21（DE3）新鲜制备的菌液，以 1%的比例进行二级培养，37℃振荡培养约 10 h 至菌液 OD_{600}值达到 1.5，将菌液梯度稀释至 1×10^4 倍，取 10 μL 稀释菌液加入到终浓度为 30 μg/mL 过滤灭菌的抗冻蛋白溶液中，以同浓度的无关蛋白 BSA 为实验对照。将菌液在 －7℃放置 0，24，48，72，96，120，144，168 h 后分别吸取 40 μL 涂平板，37℃倒置培养 24 h，进行菌落计数。以细菌的相对存活率表示抗冻蛋白的保护效果，每组取 3 个重复值。

2 结果与分析

2.1 融合蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化

将重组质粒 pGEX4T-1-*Mpafp*5、pMAL-p2x-

*Mpafp*5 和对照质粒 pGEX4T-1、pMAL-p2x 转化大肠杆菌 BL21（DE3），经 IPTG 诱导培养 4 h 后，进行 SDS-PAGE 分析，结果见图 1。pGEX4T-1-*Mpafp*5 和 pMAL-p2x-*Mpafp*5 分别在 37 和 54 kDa 处出现了融合蛋白 GST-MpAFP5 和 MBP-MpAFP5 的条带，其大小与预期的分子量一致，表明 MpAFP5 已在大肠杆菌中获得表达。通过凝胶成像系统扫描 SDS-PAGE 电泳条带的 IDV，得出 1 L 菌液可表达出约 120 mg 的 GST-MpAFP5 和 100 mg 的 MBP-MpAFP5。同时参照 Pharmacia 生物技术公司的 Glutathione Sepharose 4B 说明书和 Bio. Labs 公司的 Amylose Resin 说明书纯化所表达的蛋白，获得了纯度较高的蛋白（图 2），纯度约为 99%。

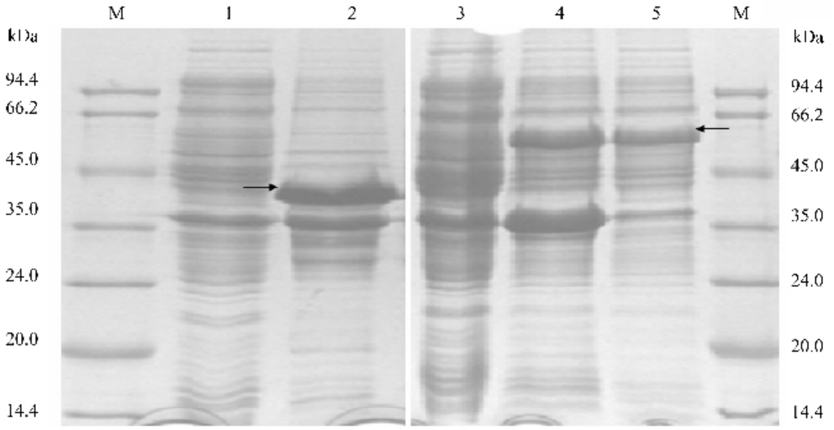

图 1 诱导表达目标蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 The SDS-PAGE analysis of the expressed MpAFP5s in *E. coli* BL21（DE3）

M：标准分子量蛋白 Protein marker；1：未经诱导的 GST-MpAFP5 Non-induced GST-MpAFP5；2：诱导的 GST-MpAFP5 Induced GST-MpAFP5；3：未经诱导的 MBP-MpAFP5 Non-induced MBP-MpAFP5；4：诱导 MBP-MpAFP5 的沉淀 Sediments of induced MBP-MpAFP5；5：诱导 MBP-MpAFP5 的上清液 Supernatants of induced MBP-MpAFP5.

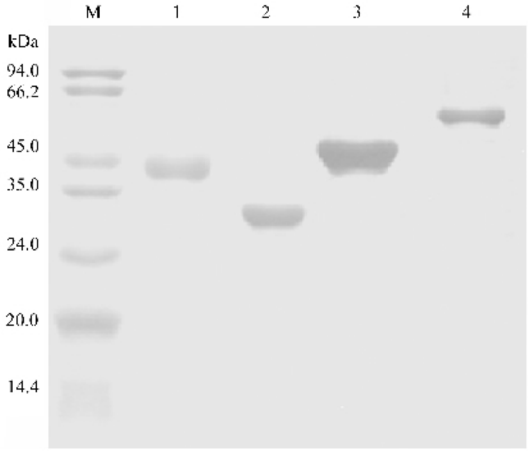

图 2 纯化蛋白 MpAFP5 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 The SDS-PAGE analysis of the purified MpAFP5s

M：标准分子量蛋白 Protein marker；1：纯化的 GST-MpAFP5 融合蛋白 Purified GST-MpAFP5；2：纯化的 GST Purified GST；3：纯化的 MBP Purified MBP；4：纯化的 MBP-MpAFP5 融合蛋白 Purified MBP-MpAFP5.

2.2 抗冻蛋白的热滞活性和热稳定性

将准噶尔小胸鳖甲不同融合抗冻蛋白的浓度调整为 0.5 mg/mL，直接测定 THA。结果表明 MBP-MpAFP5 的活性最高，为 1.36℃，GST-MpAFP5 为 0.51℃，而 MBP 和 GST 均为 0.28℃。为探讨抗冻蛋白的热稳定性，在沸水中处理 5 min 后，SDS-PAGE 分析仍然可见 MBP-MpAFP5 和 GST-MpAFP5 的电泳条带，但是 GST 条带消失，表明其已经完全变性沉淀，而两个融合蛋白在热处理和离心之后仍然存在于上清中（图 3：A）。此时，MBP-MpAFP5 的热滞值为 1.0℃，是处理前的 76.66%；GST-MpAFP5 为 0.2℃，是处理前的 37.87%；MBP 为 0.05℃，是处理前的 25.49%；而 GST 没有测到热滞值（图 3：B）。方差分析结果表明 MBP-MpAFP5 和 GST-MpAFP5 的热滞值极显著地高于对照组 BMP 和 GST（$P < 0.001$），且热处理之后的热滞活性均显著低于热处理之前。

2.3 抗冻蛋白溶液的冰晶形态

准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白溶液的冰晶形态呈棱锥型如图 4 所示。其中，MBP-MpAFP5 为典型的昆虫抗冻蛋白溶液的六棱锥型冰晶（图 4：A），GST-MpAFP5 的冰晶结构略有不同，为方棱锥型冰晶（图 4：B），而对照水溶液的冰晶为圆形（图 4：C）。

2.4 融合抗冻蛋白的抗冻保护效果

取 *E. coli* BL21（DE3）在 −7℃分别冰冻 0，24，48，72，96，120，144，168 h 后，再经过 37℃培养 24 h，进行菌落计数，将平均菌落数转化为存活率，结果见

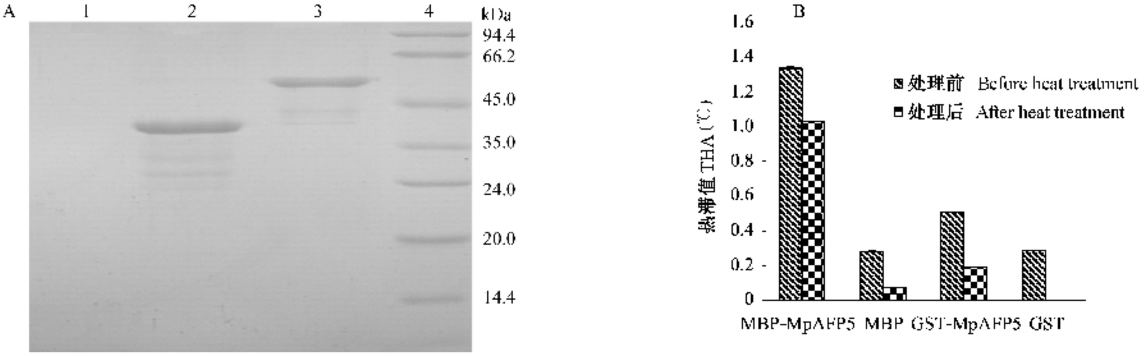

图3　抗冻蛋白的热滞值与热稳定性

Fig. 3　The thermal hysteresis activity (THA) and heat stability of fusion antifreeze proteins

A.经过热处理的蛋白溶液的 SDS-PAGE SDS-PAGE of heat treated protein. 1：GST；2：GST-MpAFP5；3：MBP-MpAFP5；4：Marker.

B.热处理前后热滞活性 Thermal hysteresis activity of proteins before and after heat treatment.

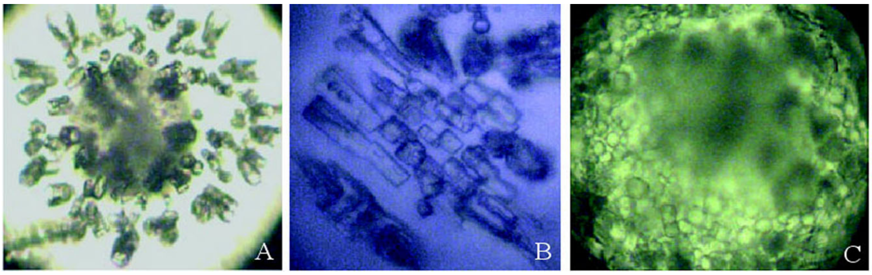

图4　准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白溶液及水的冰晶形态

Fig. 4　The ice crystal morphology of MpAFP5 solutions and water

A：MBP-MpAFP5；B：GST-MpAFP5；C：水溶液 Water.

图5。从图中可以看出在冰冻24 h时3种蛋白的低温保护效果无显著差异，但随着冰冻时间的延长，融合抗冻蛋白对细菌低温保护效果明显强于对照组BSA。菌液在低温下处理72 h时，BSA对照组中的菌落存活率几乎降为0，而在融合抗冻蛋白实验组，菌落的存活率仍保持在20%以上，尤其是在MBP-MpAFP5的保护下，细菌的存活率高达40%；在168 h时，MBP-MpAFP5组仍有10%细菌存活。从50%菌落存活的时间来看，MBP-MpAFP5组为55 h，GST-MpAFP5组为46 h，而BSA对照组仅为35 h。通过对数据进行方差分析(表1)显示，BSA对照组对细菌的低温保护效果显著性地低于两个抗冻蛋白，且MBP-MpAFP5组的保护效果显著高于GST-MpAFP5组。说明用基因工程方法得到的小胸鳖甲融合抗冻蛋白对细菌具有低温保护效果，其中大标签的MBP-MpAFP5保护效果最好。

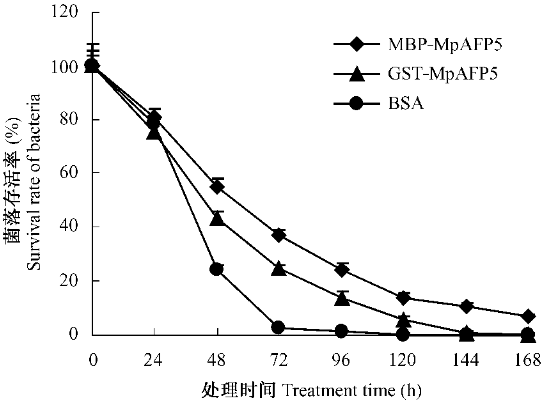

图5　不同融合蛋白MpAFP5对大肠杆菌的低温保护效果

Fig. 5　The cryoprotective effects of different fusion MpAFP5s on *E. coli*

3　讨论

从准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白MpAFP5的序列来看(赵干等，2005)，该蛋白具有昆虫抗冻蛋白典型的12个氨基酸TCTXSXXCXXAX组成的重复结构，并且GST-MpAFP5具有显著的抗冻活性。分析原核表达的不同融合抗冻蛋白的热滞值(THA)，发现在0.5 mg/mL浓度下MBP-MpAFP5的THA为1.336℃，GST-MpAFP5为0.51℃，表明两者都具有较高的热滞值。Bar等(2006)测定原核表达的黄粉虫*Tenebrio molitor*的抗冻蛋白TmAFP在2.7 mg/mL浓度的THA

表 1 不同融合抗冻蛋白与 BSA 抗冻保护效果的多重比较
Table 1 Multiple comparisons of the cryoprotective effects among different fusion MpAFP5s and BSA

蛋白质 Protein I	蛋白质 Protein J	平均值之差 Mean difference (I－J)	标准误 Standard error	显著性 Significance	95%置信区间 95% confidence interval 下界 Lower bound	95%置信区间 95% confidence interval 上界 Upper bound
BSA	GSTAFP5	－0.0726	0.0490	0.000	－0.0824	－0.0627
GSTAFP5	MBPAFP5	－0.0797	0.0490	0.000	0.0896	－0.0699
MBPAFP5	BSA	0.1523	0.0490	0.000	0.1424	－0.1621

为 5.2℃,那么换算成在 1.0 mg/mL 相同单位浓度下 MBP-MpAFP5 的 THA 为 2.67℃,GST-MpAFP5 为 1.02℃,TmAFP 为 1.93℃。说明 MBP-MpAFP5 的 THA 高于 TmAFP,而 GST-MpAFP5 的 THA 则低于 TmAFP。但 3 种昆虫抗冻蛋白的 THA 都远远高于鱼类和植物的 THA(Liou *et al*.,1999;Zhang *et al*.,2004),表明我们的原核表达条件可以获得高活性的可溶性抗冻蛋白,并且 MBP-MpAFP5 的 THA 要比 GST-MpAFP5 高出两倍之多,提示含有 MBP(麦芽糖结合蛋白)标签的融合蛋白与含有 GST(谷胱甘肽 S-转移酶)标签的融合蛋白相比较,分子量大的融合蛋白 MBP-MpAFP5 可能更有利于抗冻蛋白活性的提高。

昆虫抗冻蛋白富含半胱氨酸而且具有丰富的二硫键(Graham *et al*.,1997),其对于抗冻蛋白的热稳定性起着重要的作用(Gauthier *et al*.,1998)。对赤翅甲 *Dendroides canadensis* 天然抗冻蛋白(Li *et al*.,1998)和黑麦草 *Lolium perenne* 天然抗冻蛋白的研究(Sidebottom *et al*., 2000)发现,天然抗冻蛋白具有热稳定性。本研究的热稳定性分析发现,对照组标签蛋白 MBP 和 GST 溶液在沸水浴 5 min 处理后,冰点降低几乎为零,表明 MBP 和 GST 不具备热稳定性。MBP-MpAFP5 和 GST-MpAFP5 在沸水浴 5 min 后,冰点只有一定的降低,说明融合抗冻蛋白具有较好的热稳定性,这与酵母真核表达产物 MpAFP5 的热稳定性研究结果相一致(吕国栋等, 2006),也说明融合抗冻蛋白溶液的热稳定性是由抗冻蛋白部分引起的。抗冻蛋白具有较强的热稳定性,表明温度对抗冻蛋白的活性影响不大,这可能是荒漠昆虫的一种特殊生态适应方式。

抗冻蛋白溶液的冰晶生长形态特征可以反映抗冻蛋白的活性。有抗冻蛋白存在时溶液的冰晶为多面体,而无抗冻蛋白时冰晶为扁圆形(DeVries, 1986;Griffith and Yaish, 2004)。准噶尔小胸鳖甲两种融合抗冻蛋白溶液的冰晶形态与已知的昆虫抗冻蛋白溶液一致,表明两种抗冻蛋白都具有抑制冰晶生长的作用。

研究发现,赤翅甲抗冻蛋白的热滞活性比其血淋巴的要低,可能是小分子物质起到了抗冻蛋白增强剂的作用(Wu and Duman, 1991)。DeLuca 等(1998)研究鱼的Ⅲ型抗冻蛋白,发现 MBP-AFP 和硫氧环蛋白 TRX-AFP 的热滞值在摩尔浓度上比纯的Ⅲ型抗冻蛋白的活性高 2~3 倍,认为融合抗冻蛋白能够增强抗冻蛋白的活性。根据吸附抑制学说,抗冻蛋白分子通过结合到冰晶上而抑制其生长。融合抗冻蛋白分子要比单独的抗冻蛋白分子大得多,可覆盖更大面积的冰晶,因而使冰晶的增长更困难。通过对热滞活性、冰晶形态和抗冻保护作用的研究表明准噶尔小胸鳖甲两种融合抗冻蛋白都具有生物活性,且 MBP-MpAFP5 的活性明显高于 GST-MpAFP5,说明 MpAFP5 的融合标签部分可能是通过增大对冰晶的覆盖面,更好地阻止了冰晶的生长。是否抗冻蛋白所带的标签蛋白越大这种阻止能力就越强,还需要进一步研究和探讨。从应用的角度讲,至少大标签融合抗冻蛋白有利于表达和纯化,这将有利于抗冻蛋白作为抗冻保护剂的实际应用。

参考文献(References)

Bar M, Bar-Ziv R, Scherf T, Fass D, 2006. Efficient production of a folded and functional, highly disulfide-bonded β-helix antifreeze protein in bacteria. *Protein Expr. Purif.*, 48:243－252.

DeLuca CI, Comley R, Davies PL, 1998. Antifreeze proteins bind independently to ice. *Biophys. J.*, 74:1 502－1 508.

DeVries AL, 1986. Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water. *Methods Enzymol.*, 127:293－303.

Gauthier SY, Kay CM, Sykes BD, Walker VK, Davies PL, 1998. Disulfide bond mapping and structural characterization of spruce budworm antifreeze protein. *Eur. J. Biochem.*, 258:445－453.

Graham LA, Liou YC, Walker VK, Davies PL, 1997. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*, 388:727－728.

Griffith M, Yaish MW, 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci.*, 9:399－405.

Li N, Andorfer CA, Duman JG, 1998. Enhancement of insect antifreeze protein activity by solutes of low molecular mass. *J. Exp. Biol.*, 201: 2 243 – 2 251.

Liou YC, Thibault P, Walker VK, Davies PL, Graham LA, 1999. A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochemistry*, 38: 11 415 – 11 424.

Lv GD, Sun J, Ma J, Zhang FC, 2006. Characterization of antifreeze protein MPAFP5 from *Microdera punctipennis dzhungarica* expressed in *Pichia pastoris*. *Entomol. Knowl.*, 43(6): 821 – 826. [**吕国栋，孙洁，马纪，张富春**，2006. **准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白** MPAFP5 **毕赤酵母表达产物的理化性质**. **昆虫知识**，43(6): 821 – 826]

Sidebottom C, Buckley S, Pudney P, Twigg S, Jarman C, Holt C, Telford J, McArthur A, Worrall D, Hubbard R, Lillford P, 2000. Phytochemistry: heat-stable antifreeze protein from grass. *Nature*, 406: 256.

Tyshenko MG, Anjou M, Davies PL, Daugulis AJ, Walker VK, 2006. Challenges in the expression of disulfide bonded, threonine-rich antifreeze proteins in bacteria and yeast. *Protein Expr. Purif.*, 47: 152 – 161.

Tyshenko MG, Doucet D, Davies PL, Walker VK, 1997. The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein. *Nat. Biotechnol.*, 15: 887 – 890.

Wu DW, Duman JG, 1991. Amplification of insect antifreeze protein from the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol.*, 161: 279 – 283.

Zhang DQ, Liu B, Feng DR, He YM, Wang JF, 2004. Expression, purification, and antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants. *Protein Expr. Purif.*, 35: 257 – 263.

Zhao G, Ma J, Xue N, Yang CG, Zhuan FF, Zhang FC, 2005. Cloning of a cDNA encoding antifreeze protein in *Microdera punctipennis dzhungarica* (Coleoptera: Tenebrionidae) and its activity assay. *Acta Entomol. Sin.*, 48(5): 667 – 673. [**赵干，马纪，薛娜，杨长庚，专芳芳，张富春**，2005. **新疆准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白基因的克隆和抗冻活性分析**. **昆虫学报**，48(5): 667 – 673]

（责任编辑：赵利辉）